

(51)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Int. Cl.:

C 12 d, 9/00

C 07 d, 9/00

DEUTSCHES PATENTAMT



(52)

Deutsche Kl.:

30 h, 7

12 q, 24

(10)

(11)

(21)

(22)

(43)

**Offenlegungsschrift 2 121 517**

Aktenzeichen: P 21 21 517.8-42

Anmeldetag: 30. April 1971Offenlegungstag: 9. November 1972

Ausstellungspriorität: —

(30)

Unionspriorität

(32)

Datum: —

(33)

Land: —

(31)

Aktenzeichen: —

(64)

Bezeichnung:

Verfahren zur Gewinnung und chemischen Reinigung von  
Amphotericin B

(61)

Zusatz zu: —

(62)

Ausscheidung aus: —

(71)

Anmelder:

Leningradskij nauchno-issledowatelskij institut antibiotikow,  
Leningrad (Sowjetunion)

Vertreter gem. § 16 PatG:

Dittmann, O., Dr.; Schiff, K. L.; Fünér, A. v., Dr.; Strehl, P., Dipl.-Ing.;  
Patentanwälte, 8000 München

Als Erfinder benannt:

Kulbach, Walter Oswaldowitsch; Etingow, Jewgenij Davidowitsch;  
Nynj, Wladimir Semjonowitsch; Malkow, Mark Abowitsch; Leningrad  
(Sowjetunion)

(56)

Rechercheantrag gemäß § 28 a PatG ist gestellt

Prüfungsantrag gemäß § 28 b PatG ist gestellt

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

US-PS 2 908 611

DT 2121517

BEST AVAILABLE COPY

B e s c h r e i b u n g  
zu der  
Patentanmeldung  
des

Leningradskij nauchno-issledowatel'skij institut  
antibiotikov, SSSR, Leningrad, prospekt Ogorodnikowa, 23

betreffend

VERFAHREN ZUR GEWINNUNG UND CHEMISCHEN REINIGUNG VON  
AMPHOTERIZIN B

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Gewinnung und Reinigung von Antibiotika, insbesondere auf ein Verfahren zur Gewinnung und chemischen Reinigung von Amphoterizin B, das zu den makroliden Heptaantibiotika gehört.

Das Amphoterizin B findet Verwendung in der medizinischen Praxis bei der Behandlung tiefer Mykosen und anderer Pilzkrankungen.

Es sind bekannt Verfahren zur Gewinnung und chemischen Reinigung von Amphoterizin B, z.B. ein Verfahren, das darin besteht, daß man das Rohantibiotikum, gelöst in Dimethylformamid, mit Wasser ausfällt, dann den Niederschlag abfiltriert,

- 2 -

mit Azeton wäscht und unter Vakuum trocknet. In einem anderen Verfahren löst man das Rohantibiotikum in wässrigem Isopropylalkohol bei einem pH - Wert von 2 - 3 auf, filtriert den nichtgelösten Niederschlag ab, neutralisiert die Lösung auf einen pH - Wert von 5 - 7, filtriert den entstandenen Niederschlag des Antibiotikums ab, wäscht es mit Azeton und trocknet unter Vakuum.

Es ist auch ein Verfahren bekannt, in welchem man das Rohantibiotikum aus einer Methanollösung von Kalziumchlorid mit Wasser umfällt und anschließend dieses wäscht und trocknet. Die Aktivität des nach den genannten Verfahren erhaltenen Endproduktes beträgt 750 mkg/mg (USA - Patentschrift Nr. 2908611. J. Vandeputte et al. Antibiotics Ann. 1955 - 56, p. 587).

Ein Nachteil der genannten Verfahren ist, daß keines von diesen eine Reinigung des Amphoterizins B von dem dieses begleitenden inaktiven Heptaen vorsieht. Das letztere bildet sich zusammen mit dem Antibiotikum im Prozeß der Fermentation des Produzenten *Actinomyces nodosus*. Der genannte Umstand verschlechtert die Qualität des Fertigproduktes.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, den genannten Nachteil zu vermeiden.

In Übereinstimmung mit dem Ziel wurde die Aufgabe gestellt durch die Wahl einer neuen wässrig - organischen Komposition und eines entsprechenden technologischen Ver -

- 3 -

fahrens die Qualität des Endproduktes zu erhöhen.

Diese Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß man in dem Verfahren zur Gewinnung und chemischen Reinigung von Amphoterizin B durch dessen Ausfällen mit Wasser aus Rohantibiotikumlösung in Dimethylformamid unter anschließendem Waschen mit einem organischen Lösungsmittel erfindungsgemäß der Rohantibiotikumlösung in Dimethylformamid 0,5 Volumen destilliertes Wasser, bezogen auf das Volumen des Dimethylformamids, zusetzt, das erhaltene Gemisch auf einen pH - Wert von 2 - 3,6 ansäuert, die ausgefallenen Beimengungen abtrennt, dem Filtrat Wasser in einem Volumen zusetzt, das dem Ausgangslösungsmittel gleich ist, dann den pH - Wert des Gemisches auf 6,5 - 7,0 bringt und das Endprodukt abtrennt, welches mit wässrigem n - Propanol, und Azeton gewaschen und getrocknet wird.

Man bereitet zweckmäßig die Rohantibiotikumlösung in Dimethylformamid durch Vermischen von 1 Gewichtsteil Rohantibiotikum mit 10 - 20 Volumen Dimethylformamid unter anschließendem Ansäuern des erhaltenen Gemisches mit Salzsäure auf einen pH - Wert von 7 - 7,5.

Das Ansäuern des Gemisches auf einen pH - Wert von 2 - 3,6 führt man zweckmäßig mit 10%iger wässriger Salzsäurelösung durch. Das Alkalisieren des Gemisches auf einen pH - Wert von 6,5 - 7,0 führt man zweckmäßig mit 10%iger wässriger Natriumcarbonatlösung durch. Man verwendet zweckmäßig zum Waschen

des Endproduktes 50%ige wässrige n - Propanollösung.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird wie folgt durchgeführt. Das Ausgangs - Rohamphoterizin B löst man in Dimethylformamid auf. Man bereitet zweckmäßig eine Suspension von Rohamphoterizin B in Dimethylformamid. Dazu mischt man 1 Gewichtsteil Rohamphoterizin B mit 10 - 20 Volumen Dimethylformamid. Dann säuert man unter Rühren das Gemisch mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH - Wert von 7 - 7,5 an. Das Gemisch wird noch 1,5 - 2 Stunden bis zur vollständigen Auflösung der Heptaene gerührt. Dann gießt man langsam unter Rühren destilliertes Wasser in einer Menge von 0,5 Volumen zu, bezogen auf das Volumen des eingesetzten Dimethylformamids. Man stellt das Gemisch auf einen pH - Wert von 2,0 - 3,6 mit 10%iger Salzsäurerelösung ein. Der ausgefallene Niederschlag, der im wesentlichen aus inaktiven Heptaenen besteht, wird durch Filtration oder Schleudern abgetrennt und verworfen. Der klaren Lösung gießt man unter Rühren destilliertes Wasser in einer Menge von 1 Volumen zu, bezogen auf das Volumen des Dimethylformamids. Man stellt das Gemisch auf pH von 6,5 - 7,0 durch Zugabe 10%iger Ätznatronlösung ein und filtriert oder schleudert die entstandene Suspension des Antibiotikums. Die erhaltene Paste wäscht man mit 50%iger wässriger n - Propylalkohollösung, dann mit Azeton und trocknet unter Vakuum. Man erhält Amphoterizin B mit einer spezifischen Aktivität

von über 750 mkg/mg, einem Aschegehalt von weniger als 0,5%.

Das erfindungsgemäße Verfahren macht es möglich, Amphotericin B hohen Reinheitsgrades zu erhalten, das zur Herstellung von Injektionsarzneiformen bestimmt ist.

Nachstehend wird die Erfindung anhand von Beispielen für die Durchführung des Verfahrens zur Herstellung von Amphotericin B näher erläutert.

Beispiel 1. 25 g Rohamphotericin B mit einer spezifischen biologischen Aktivität von 500 mkg/mg, einer Extinktion  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1100$  und einem Gehalt an Amphotericin A weniger als 5% mischt man mit 500 ml Dimethylformamid bei einer Temperatur von 20°C. Unter Rühren bringt man das Gemisch auf einen pH-Wert von 7,2 mit konzentrierter Salzsäure. Das Gemisch rührt man noch 1,5 Stunden. Der erhaltenen Lösung gießt man langsam während 1 Stunde unter Rühren 250 ml destilliertes Wasser zu. Man stellt ein pH des Gemisches von 3,2 durch Zugabe 10%iger Salzsäurelösung ein. Der ausgefallene Niederschlag wird unter Vakuum abfiltriert und verworfen. Der klaren Lösung gießt man unter Rühren 500 ml destilliertes Wasser zu. Man stellt im Gemisch ein pH von 6,5 durch Zugabe 10%iger wässriger Ätznatronlösung ein und schleudert die entstandene Suspension. Die erhaltene Paste des Antibiotikums wäscht man unter Rühren mit 500 ml 50%igen wässrigen n-Propylalkohols während 2 Stunden bei Zimmertemperatur. Nach beendetem Waschen wird die Paste geschleudert, mit Azeton gewaschen, filtriert

und unter Vakuum bei einem Restdruck von 10 Torr und einer Temperatur von 20°C getrocknet. Das Gewicht des Fertigproduktes beträgt 8,0 g, die spezifische biologische Aktivität des Pulvers 800 mkg/mg und die Extinktion  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1500$ . Die Ausbeute an Amphotericin B, bezogen auf die im Rohprodukt enthaltene Aktivität, beträgt 51%.

Beispiel 2. 100 g Rohamphotericin B mit einer spezifischen biologischen Aktivität von 500 mkg/mg, einer Extinktion  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1150$  und einem Gehalt an Amphotericin A weniger als 5% bringt man in einen mit einem Rührwerk versehenen emaillierten Apparat ein. Man gießt 1 Liter Dimethylformamid zu und bringt unter Rühren den pH-Wert des Gemisches auf 7,0 durch Zugabe konzentrierter Salzsäure. Das Gemisch rührt man noch 2 Stunden. Der erhaltenen Lösung gießt man langsam während 1,5 Stunden unter Rühren 45 Liter destilliertes Wasser zu. Man stellt im Gemisch ein pH von 2,8 durch Zugabe konzentrierter Salzsäure ein. Der ausgefallene Niederschlag wird durch Schleudern abgetrennt und verworfen. Der klaren Lösung im emaillierten Apparat gießt man unter Rühren 1 Liter destilliertes Wasser zu. Man stellt im Gemisch ein pH von 6,8 durch Zugabe 10%iger wässriger Ätznatronlösung ein und trennt den ausgefallenen Niederschlag des Antibiotikums durch Schleudern ab. Die erhaltene Paste wäscht man im emaillierten Apparat mit 2 Liter 50%igen wässrigen n-Propylalkohols während 3 Stunden bei Zimmertemperatur. Nach beendeter

- 7 -

Waschen schleudert man die Paste, wäscht mit Azeton, filtriert und trocknet unter Vakuum bei einem Restdruck von 10 Torr und einer Temperatur von 20°C. Das Gewicht des Fertigproduktes beträgt 20 g, die spezifische biologische Aktivität des Pulvers 900 mkg/mg und die Extinktion  $E_{1cm}^{1\%} = 1500$ . Die Ausbeute an Amphotericin B, bezogen auf die im Rohprodukt enthaltene Aktivität, beträgt 36%.



- 8 -

8

## PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Gewinnung und chemischen Reinigung von Amphotericin B durch dessen Ausfällen mit Wasser aus Lösungen von Rohantibiotikum in Dimethylformamid unter anschließendem Waschen mit einem organischen Lösungsmittel, dadurch gekennzeichnet, daß man der Rohantibiotikumlösung in Dimethylformamid 0,5 Volumen destilliertes Wasser, bezogen auf das Volumen des Dimethylformamids, zusetzt, das erhaltene Gemisch auf einen pH-Wert von 2 - 3,6 ansäuert, die ausgefallenen Verunreinigungen abtrennt, dem Filtrat Wasser in einer Menge, die der des Ausgangslösungsmittels gleich ist, zusetzt, dann den pH-Wert des Gemisches auf 6,5 - 7,0 bringt und das Endprodukt abtrennt, das mit wässrigem n-Propanol und Azeton gewaschen und getrocknet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Rohantibiotikumlösung in Dimethylformamid durch Vermischen von 1 Gewichtsteil Rohantibiotikum mit 10 - 20 Volumen Dimethylformamid und anschließendes Ansäuern des erhaltenen Gemisches auf einen pH-Wert von 7 - 7,5 durch konzentrierte Salzsäure bereitet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 - 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das Ansäuern des Gemisches auf einen pH-Wert von 2 - 3,6 durch Zugabe 10%iger wässriger

Salzsäure-lösung durchführt.

4. Verfahren nach Anspruch 1 - 3, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t , daß man das Alkalisieren des  
Gemisches auf einen pH - Wert von 6,5 - 7,0 durch Zugabe  
10%iger wässriger Ätznatronlösung durchführt.

5. Verfahren nach Anspruch 1 - 4, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t , daß das Endprodukt mit 50%igem  
wässrigem n - Propanol gewaschen wird.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**